

DOCKET NO.: 258087US0XPCT

DT09 Rec PCT/PTO 02 SEP 2004

10/506334 #2

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Boris LINARD, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/FR03/00698

INTERNATIONAL FILING DATE: March 4, 2003

FOR: PEPTIDES FOR USE IN ANTITUMOR IMMUNOTHERAPY

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

COUNTRY

France

APPLICATION NO

02 02703

DAY/MONTH/YEAR

04 March 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/FR03/00698.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

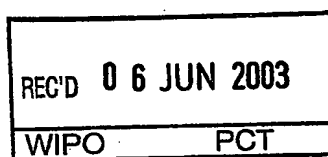
22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

BEST AVAILABLE COPY

PCT/FR 03/00698
Rec'd PCT/PTO 10/506334
02 SEP 2004

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 07 MARS 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ
PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



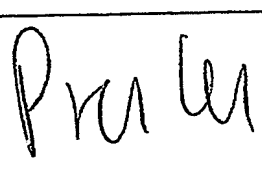
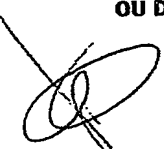
N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE EN FORME DATE 4 MARS 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 4 MARS 2002 Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPCb598/64FR		NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET ORES 6 AVENUE DE MESSINE 75008 PARIS	
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date : ____/____/____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date : ____/____/____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date : ____/____/____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PEPTIDES RAS MUTES ET LEUR UTILISATION EN IMMUNOTHERAPIE			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date : ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date : ____/____/____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse	Rue	101, rue de Tolbiac	
	Code postal et ville	75013	PARIS
Pays		FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)			
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PAGES DATE 4 MARS 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0202703		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		MJPCb598/64FR	
<input checked="" type="checkbox"/> MANDATAIRE			
Nom		VIALLE-PRESLES	
Prénom		Marie-José	
Cabinet ou Société		CABINET ORES	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	6 AVENUE DE MESSINE	
	Code postal et ville	75008	PARIS
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01.45.62.75.00	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01.45.62.04.86	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		ores@cabinet-ores.com	
<input checked="" type="checkbox"/> INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
<input checked="" type="checkbox"/> RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en trois versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
<input checked="" type="checkbox"/> RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		1	
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...

RESERVÉ À L'INPI	
REMISE EN MARCHE 15 MARS 2002	
DATE 15 MARS 2002	
LIEU 75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT 0202703	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	
Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire	
08 829 W / 260899	
Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPCb598/64FR	
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE	
Pays ou organisation N° Date : / /	
Pays ou organisation N° Date : / /	
Pays ou organisation N° Date : / /	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR	
Nom ou dénomination sociale UNIVERSITE DE NANTES	
Prénoms	
Forme juridique Etablissement public	
N° SIREN	
Code APE-NAF	
Adresse Rue 1, quai de Tourville	
Code postal et ville 44000 NANTES	
Pays FRANCE	
Nationalité Française	
N° de téléphone (facultatif)	
N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR	
Nom ou dénomination sociale	
Prénoms	
Forme juridique	
N° SIREN	
Code APE-NAF	
Adresse Rue	
Code postal et ville	
Pays	
Nationalité	
N° de téléphone (facultatif)	
N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)	
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)	
Pm Un	
VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

La présente invention est relative à des peptides ras mutés et à leur utilisation en immunothérapie.

La vaccination ou immunothérapie peptidique est une approche thérapeutique qui fait actuellement l'objet d'un grand intérêt dans le cadre de la prévention ou du traitement des pathologies virales ou cancéreuses. Son principe repose sur l'immunisation par des peptides reproduisant des épitopes T d'antigènes viraux ou tumoraux reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), qui jouent un rôle majeur dans l'élimination des cellules exprimant ces antigènes à leur surface.

On rappellera que les CTL ne reconnaissent pas les antigènes protéiques entiers, mais des fragments peptidiques de ceux-ci, présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) exprimées à la surface de différentes cellules. Les peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ont généralement 8 à 11 acides aminés, et sont reconnus par les cellules T CD8+, qui représentent la composante majeure de la réponse cytotoxique. Les peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) ont généralement 13 à 18 acides aminés et sont reconnus par les cellules T CD4+.

Des études effectuées sur des modèles animaux ont permis d'identifier des antigènes de rejet tumoral, dont un grand nombre sont des protéines mutées oncogènes (PREHN et al., J. Natl. Cancer Inst., 18, 769, 1998 ; DE PLAEN et al., PNAS, 85, 2274, 1988 ; DUBEY et al., J. Exp. Med., 185, 695, 1997). La présentation par des molécules du CMH des fragments mutés de ces protéines à la surface des cellules tumorales induit la destruction spécifique de celles-ci par les CTL et le rejet de la tumeur.

Chez l'homme, les protéines mutées oncogènes apparaissent également comme des cibles particulièrement intéressantes pour l'immunothérapie anti-tumorale. Toutefois, ceci implique d'identifier les épitopes présentés à la surface des cellules tumorales et capables d'induire une réponse T cytotoxique.

Parmi les oncogènes les plus fréquemment impliqués dans différents types de tumeurs, on citera les oncogènes *ras* (*K-ras*, *H-ras* et *N-ras*) qui résultent de mutations ponctuelles (substitution d'un seul acide aminé) des proto-oncogènes *ras* p21. Ces mutations interviennent essentiellement au codon 12, au codon 13, ou au codon 61 (BOS, Cancer Res., 49, 4682, 1989 ; WEIJZEN et al., Leukemia, 13, 502, 1999). Du fait du nombre limité de substitutions oncogéniques pouvant intervenir, des mutations *ras* présentes dans de nombreuses tumeurs identiques peuvent ainsi générer des épitopes tumoraux partagés, présentés par une fraction significative de tumeurs humaines (WEIJZEN et al., Leukemia, 13, 502, 1999).

Il a ainsi été proposé d'utiliser en immunothérapie anti-tumorale des peptides synthétiques reproduisant des épitopes *ras* mutés. Ainsi, la demande PCT WO 92/14756 propose l'utilisation de peptides reproduisant des épitopes *ras* mutés au codon 12 ou au codon 61. Toutefois ces épitopes sont présentés par le CMH II (DQ et DR), et induisent donc une réponse CD4+. Or, bien qu'il puisse être avantageux d'induire ce type de réponse, dans la mesure où les lymphocytes auxiliaires CD4+ permettent d'augmenter la réponse cytotoxique (WALTER et al., N. Engl. J. Medicine, 333, 1038, 1995), la réponse CD8+ demeure l'acteur essentiel de la cytotoxicité. En outre, des études récentes effectuées chez la souris suggèrent que l'immunisation avec des peptides présentés par le CMH II pourrait induire une stimulation de la croissance tumorale au lieu de la protection espérée (SIEGEL et al., J. Exp. Med., 191, 1945, 2000).

Plusieurs épitopes *ras* mutés aux positions 12, 13 ou 61 ont sélectionnés sur la base de leur capacité d'ancrage à des molécules du CMH de classe I (VAN ELSAS et al., Int. J. Cancer, 61, 389, 1995 ; BERGMANN et al., Cell Immunol., 187, 103, 1998 ; GOUTTEFANGEAS et al., Human Immunol., 55, 117, 1997). Les peptides ainsi sélectionnés peuvent stimuler la croissance de CTL spécifiques à partir de PBL *in vitro*. Mais ces CTL reconnaissent faiblement les cellules tumorales mutées, suggérant que l'expression endogène de ces épitopes

est limitée (VAN ELSAS et al., Int. J. Cancer, 61, 389, 1995 ; ABRAMS et al., Cell Immunol., 182, 137, 1997 ; BERGMANN et al., Cell Immunol., 187, 103, 1998), et qu'ils ne permettent donc pas l'élimination efficace des cellules
5 tumorales par des CTL spécifiques, ce qui limite considérablement leur intérêt en immunothérapie.

Il apparaît donc nécessaire de disposer d'autres épitopes ras mutés restreints au CMH I et présentés efficacement par une fraction significative de tumeurs
10 humaines.

Les Inventeurs ont maintenant identifié un épitope ras muté en position 61 par substitution d'une glutamine par une arginine (Q61R), et restreint au CMH I. Cet épitope, dénommé ci-après 55-64^{Q61R} est présenté efficacement
15 par plusieurs lignées de mélanome HLA-A*0101+ exprimant un oncogène ras portant la mutation Q61R. Il est capable d'induire spécifiquement l'expansion de clones de lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) obtenus à partir de ces mélanomes. De plus, les cellules dendritiques chargées avec
20 ce peptide stimulent de façon efficace des CTL spécifiques à partir de lymphocytes du sang périphérique (PBL) de donneurs sains HLA-A*0101, et ces CTL reconnaissent toutes les lignées de mélanomes HLA-A*0101 exprimant l'oncogène ras Q61R, et ne reconnaissent pas les cellules exprimant la protéine ras non-
25 mutée.

Le peptide 55-64^{Q61R} ne possède pas une capacité d'ancrage supérieure à celle du peptide de type sauvage correspondant. L'affinité de liaison à HLA-A*0101 du peptide de type sauvage est similaire à celle du peptide 55-64^{Q61R}.
30 Cependant, même à concentrations élevées, ce peptide de type sauvage ne peut induire ni l'expansion de TIL spécifiques, ni celle de CTL spécifiques. Il apparaît donc que la substitution d'une glutamine par une arginine en position 61 crée un nouvel épitope présenté par HLA-A*0101. D'autres
35 mutations de l'oncogène ras à la même position, et notamment la substitution de la glutamine par une proline, une lysine, une histidine ou une leucine, qui sont exprimées dans

différentes formes de cancer, peuvent créer de la même manière de nouveaux épitopes T présentés par HLA-A*0101.

En conséquence, la présente invention a pour objet un peptide ras muté immunogène présenté par le CMH I, choisi parmi les peptides suivants :

- ILDTAGREEY (SEQ ID NO: 1) ;
- ILDTAGPEEY (SEQ ID NO: 2) ;
- ILDTAGKEEY (SEQ ID NO: 3) ;
- ILDTAGHEEY (SEQ ID NO: 4) ;
- ILDTAGLEEY (SEQ ID NO : 5).

Les peptides conformes à l'invention peuvent être utilisés pour l'obtention de médicaments, utilisables notamment pour l'immunothérapie antitumorale, et en particulier pour le traitement de tumeurs exprimant une protéine K-ras, H-ras ou N-ras mutée par substitution de la glutamine en position 61 par une arginine, une proline, une lysine, une histidine ou une leucine. On citera notamment les mélanomes, ainsi que d'autres tumeurs dans lesquelles les mutations ras affectant le résidu 61 sont détectées avec une fréquence élevée, telles que les nævi mélanocytiques congénitaux (PAPP et al., Journal of Medical Genetics, 36, 610, 1999), les myélomes multiples (BEZIEAU et al., Hum. Mutat., 18, 281, 2001), et les tumeurs de la thyroïde (ESAPA et al., Clinical Endocrinology, 50, 529, 1999).

Ces peptides peuvent être en particulier utilisés pour le traitement de patients HLA-A*0101, ainsi que de patients HLA-B*1501.

En effet, une analyse effectuée sur la banque de données BIMAS ([http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla bind](http://bimas.dcrt.nih.gov/molbio/hla_bind) ; PARKER et al., J. Immunol. 152, 163, 1994), montre que ces peptides ont un score de liaison identique pour ces deux allèles.

La présente invention englobe également des compositions comprenant au moins un peptide ras muté conforme à l'invention. Avantageusement, il s'agit de compositions multiépitopiques, capables de générer une réponse CTL polyspécifique, et qui comprennent en outre un ou plusieurs autre(s) peptides immunogène(s). Ces peptides peuvent

représenter des épitopes issus du même antigène, ou de deux ou plusieurs antigènes différents.'

Avantageusement, des compositions multi-épitopiques conformes à l'invention peuvent comprendre, pour être plus largement utilisables sur une population dont les individus portent des allèles HLA différents, un ou plusieurs peptides présentés par des molécules du CMH I autres que HLA-A*0101 ou HLA-B*1501.

Des compositions conformes à l'invention peuvent notamment comprendre un polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide immunogène conforme à l'invention. Dans le cas d'une composition multiépitopique, ledit polypeptide chimérique comprend en outre une ou plusieurs copies d'au moins un autre épitope immunogène.

Des polypeptides chimériques conformes à l'invention peuvent être facilement obtenus par des méthodes connues en elles-mêmes, et notamment par les techniques classiques de l'ADN recombinant.

La présente invention a également pour objet un polynucléotide codant pour un peptide *ras* muté ou pour un polypeptide chimérique conforme à l'invention, ainsi qu'un vecteur d'acide nucléique contenant ledit polynucléotide.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un peptide *ras* muté, d'une composition, d'un polypeptide chimérique ou d'un polynucléotide conforme à l'invention pour l'obtention d'un médicament anti-tumoral.

On peut par exemple, injecter au patient à traiter un peptide *ras* muté, un polypeptide chimérique, une composition multiépitopique, conforme à l'invention éventuellement associés à un adjuvant approprié.

On peut également utiliser un peptide *ras* muté conforme à l'invention pour charger *in vitro* des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles, notamment des cellules dendritiques HLA-A*0101 ou HLA-B*1501 afin d'induire la prolifération de CTL anti-tumeurs, comme décrit par exemple par BAKKER et al. (Cancer Res., 55, 5330-5334, 1995) ou VAN ELSAS et al. (Eur. J. Immunol., 26, 1683-1689, 1996).

Les cellules présentatrices de l'antigène chargées de la sorte font également partie de l'objet de la présente invention.

Les polynucléotides conformes à l'invention de
5 préférence intégrés dans des vecteurs d'acide nucléique, notamment des vecteurs viraux tels que des adénovirus, peuvent également être administrés par injection au patient à traiter. Ils peuvent également être utilisés pour transfecter
10 *in vitro* des cellules présentatrices de l'antigène professionnelles, notamment des cellules dendritiques, qui sont ensuite injectées au patient, comme décrit par exemple par KAPLAN et al. (J. Immunol., 163(2), 699-707, 1999) ou KIM et al. (Annals of Surgical Oncology, 5(1), 64-76, 1998). Ces
15 cellules présentatrices de l'antigène transfectées font également partie de l'objet de la présente invention.

Des peptides ras mutés conformes à l'invention peuvent également être utilisés pour réaliser le tri spécifique des CTL de patients porteurs de ces mutations. Des
20 peptides ras mutés conformes à l'invention peuvent être complexés à des molécules du CMH dans cette optique. Ces CTL ainsi isolés peuvent ensuite être amplifiés *in vitro* et réinjectés en grand nombre (de l'ordre du milliard) au patient.

La présente invention a également pour objet des
25 compositions thérapeutiques comprenant, en tant que principe actif, un peptide ras muté, une composition multiépitopique, un polypeptide chimérique, un polynucléotide, ou une cellule présentatrice de l'antigène conforme à l'invention.

Les compositions thérapeutiques conformes à
30 l'invention peuvent comprendre en outre les excipients usuels, ainsi que des adjuvants habituellement utilisés en immunothérapie, et permettant par exemple de favoriser l'administration du principe actif, de le stabiliser, d'augmenter son immunogénicité, etc.

35 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant les propriétés de peptides ras mutés conformes à l'invention

utilisables en immunothérapie, par la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention.

EXEMPLE 1 : ANTIGENICITE DU PEPTIDE RAS MUTE 55-64^{Q61R}

Les peptides ras de type sauvage 55-64^{WT}
 5 (ILDITAGQEEY) et les décamères mutés 55-64^{Q61R} (ILDITAGREEY),
 55-64^{Q61K} (ILDITAGKEEY), 52-61^{Q61R} (LLDILDITAGR) et le peptide
 MAGE-3 (EVDPIGHLIY) ont été obtenus auprès de SYNT:EM (Nîmes,
 France). La pureté (>85%) est contrôlée par chromatographie
 10 lyophilisés, puis dissous dans du DMSO à 10 mg/ml et stockés
 à -80°C.

L'antigénicité du peptide 55-64^{Q61R} et celle de
 son analogue de type sauvage (55-64^{WT}), sont évaluées en
 testant la capacité de ces peptides à induire la croissance
 15 de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques par
 stimulation *in vitro* de cellules mononucléées du sang
 périphérique (PBMC) par des cellules dendritiques (DC)
 pulsées avec ces peptides.

Les lymphocytes CD8+ sont obtenus à partir des
 20 PBMC d'un donneur HLA-A*0101 par tri négatif des cellules T
 CD4+ sur billes magnétiques (MILTENY BIOTECH, France).

Les cellules dendritiques sont préparées à partir
 de PBMC adhérentes mises en culture pendant 7 jours dans des
 plaques de culture à 6 puits contenant du milieu de culture
 25 RPMI additionné de sérum de veau fœtal 10%, 50 ng/ml de GM-
 CSF (SIGMA) et 50 ng/ml d'IL-4 (SIGMA). A J+7, la maturation
 des cellules dendritiques est induite pendant 2 jours dans un
 milieu de culture RPMI additionné de sérum de veau fœtal 10%,
 10 ng/ml de TNF- α (SIGMA) et 100 μ g/ml de Poly-IC (SIGMA). A
 30 J+9, les cellules dendritiques matures sont incubées pendant
 2 heures avec 5 μ g/ml de peptide ras 55-64^{Q61R} ou de peptide
 ras 55-64^{WT} ; elles sont ensuite lavées pour éliminer les
 peptides libres.

Les cellules dendritiques pulsées avec le peptide
 35 ras 55-64^{Q61R} ou le peptide ras 55-64^{WT} sont utilisées pour
 stimuler les lymphocytes CD8+ (3.10^7 cellules).
 3 stimulations sont effectuées à une semaine d'intervalle.

Chaque puits de culture est testé pour la présence de CTL spécifiques du peptide.

Dans ce but, 7 jours après la dernière stimulation, des 2.10^6 cellules BM36.1 (cellules déficientes en transporteur TAP et exprimant HLA-A*0101 (KELLY et al., Nature, 355, 641, 1992) préalablement incubées à 37°C pendant 12 heures dans du RPMI additionné de 100 μ M de peptide N-ras 55-64^{WT} ou 55-64^{Q61R}, 1 μ M de β 2 microglobuline, et lavées dans du PBS, sont ajoutées dans chaque puits.

La réponse CTL spécifique à la stimulation par le peptide N-ras de type sauvage ou muté est mesurée par dosage de l'interféron γ (IFN- γ), comme décrit par LABARRIERE et al. (Int. J. Cancer, 78, 209, 1998).

Deux des cinq puits de culture stimulés avec le peptide ras présentent une prolifération de CTL spécifique du peptide (0,3 et 0,5% de cellules réactives par puits), alors qu'aucune prolifération n'est observée dans les puits stimulés avec le peptide 55-64^{WT}.

EXEMPLE 2 : PROPRIETES D'UN CLONE DE LYMPHOCYTES T INDUIT PAR LE PEPTIDE 55-64^{Q61R}

Des clones lymphocytaires ont été obtenus par dilution limite à partir des cellules du puits de culture contenant 0,5% de cellules T réactives.

La capacité des cellules T issues de l'un de ces clones à lyser des cellules BM36.1 présentant le peptide 55-64^{Q61R} ou le peptide 55-64^{WT} est évaluée selon un dosage standard de libération du ⁵¹Cr (HERIN et al., Int. J. Cancer, 39, 390-396, 1987).

Des cellules BM36.1 marquées avec du ⁵¹Cr (Na²⁵¹CrO₄, ORIS, Gif-sur-Yvette, France). Les cellules sont ensuite pulsées pendant 1 heure à 37°C avec 10 μ M de peptide 55-64^{WT} ou de peptide 55-64^{Q61R}, et lavées. 10³ cellules BM36.1 ainsi traitées sont incubées avec 5.10³ cellules T du clone à tester pendant 4 heures. Les surnageants de culture sont récupérés et le pourcentage de ⁵¹Cr libéré est évalué.

On observe une lyse importante des cellules BM36.1 pulsées avec le peptide ras muté 55-64^{Q61R}. En

revanche, la lyse des cellules BM36.1 pulsées avec le peptide ras de type sauvage est très faible.

La spécificité de ce clone vis-à-vis de cellules exprimant HLA-A*0101 et la protéine sauvage ou la protéine N-ras portant la mutation Q61R est évaluée sur des cellules COS transfectées, ou sur des cellules de mélanome HLA-A*0101, exprimant ou non la mutation Q61R.

Pour la transfection des cellules COS, un ADNc de 334 pb codant pour un fragment de la protéine N-ras de type sauvage est obtenu par amplification PCR, à partir d'ADNc complet de la protéine N-ras sauvage. Un ADNc codant pour un fragment de la protéine N-ras muté à la position 61 par substitution de la glutamine par une arginine est obtenu par mutagenèse dirigée.

L'ADNc sauvage ou muté est inséré dans le vecteur pcDNA3 et amplifié dans la souche bactérienne *E. coli* TOP 10 F' (INVITROGEN, référence C2020-03).

Un ADNc codant pour la molécule HLA-A*0101 est introduit dans le vecteur pcDNA 3.1 (INVITROGEN, référence CV790-20).

Des cellules COS sont co-transfectées avec ces constructions comme décrit ci-après :

Des cellules COS-7, (BRICHARD et al., J. Exp. Med., 178, 489, 1993) sont cultivées dans le milieu DMEM (BIOWHITTAKER) contenant du sérum de veau fœtal 10%, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine (SIGMA, St Louis, USA) et 2 mM de glutamine-L (SIGMA, St Louis, USA).

$16,5.10^3$ cellules COS sont co-transfectées avec 100 ng d'un mélange du vecteur pcDNA 3.1 exprimant HLA-A*0101 et d'un vecteur pcDNA3 exprimant la protéine N-ras sauvage ou mutée, par le procédé chloroquine-dextrane-DEAE (BRICHARD et al., J. Exp. Med., 178, 489, 1993 ; SEED et al., PNAS, 84, 3365, 1987,). Les détails de cette méthode sont décrits par DE PLAEN et al. (Methods, 12, 125, 1997).

La stimulation des cellules T est mesurée par dosage du TNF (DE PLAEN et al., Methods, 12, 125, 1997 ; LABARRIERE et al., Int. J. Cancer, 78, 209, 1998).

2.10³ à 10⁴ cellules du clone T testé sont ajoutées à 3.10⁴ cellules COS, 48 heures après transfection, ou à 3.10⁴ cellules de mélanome. Les surnageants de culture sont récupérés 6 heures plus tard et leur contenu en TNF est déterminé en mesurant leur effet cytotoxique sur le clone 13 du fibrosarcome murin WEHI 164 (BRICHARD et al., J. Exp. Med., 178, 489, 1993) par dosage colorimétrique MTT. Les résultats obtenus avec les cellules cos transfectées sont présentés dans la Figure 1a.

En abscisse, peptides *ras* de type sauvage ou mutés à la position 61 par substitution de la glutamine par une arginine.

En ordonnée, concentration de TNF en pg/ml

Les résultats montrent que les cellules T du clone sont fortement stimulées par les cellules exprimant la protéine N-*ras* Q61R, alors qu'on n'observe qu'une faible stimulation avec la protéine N-*ras* sauvage.

Les résultats obtenus avec les cellules de mélanome sont présentés dans la Figure 1b :

En abscisse, lignées cellulaires de mélanome exprimant la mutation *ras* Q61R (M6, M90, MEL4) ou non (M36, M105, M106, M122, M138, MV1).

En ordonnée, concentration de TNF en pg/ml

Ces résultats montrent que parmi les lignées de mélanome HLA-A*0101, seules celles exprimant la mutation Q61R (lignées M6, M90 et MEL4) stimulent une réponse des cellules T du clone.

REVENDICATIONS

1) Peptide ras muté immunogène présenté par le CMH I, choisi parmi les peptides suivants :

- 5 ILDTAGREEY (SEQ ID NO: 1) ;
ILDTAGPEEY (SEQ ID NO: 2) ;
ILDTAGKEEY (SEQ ID NO: 3) ;
ILDTAGHEEY (SEQ ID NO: 4) ;
ILDTAGLEEY (SEQ ID NO: 5).

10 2) Composition comprenant au moins un peptide ras muté selon la revendication 1.

3) Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs autre(s) peptide(s) immunogène(s).

15 4) Polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide ras muté selon la revendication 1.

5) Polypeptide chimérique selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une ou plusieurs copies d'un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s).

20 6) Polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique selon une quelconque des revendications 4 ou 5.

7) Utilisation d'un peptide selon la revendication 1, pour l'obtention d'un médicament.

25 8) Utilisation d'une composition selon une quelconque des revendications 2 ou 3, pour l'obtention d'un médicament.

9) Utilisation d'un polypeptide chimérique selon une quelconque des revendications 4 ou 5 pour l'obtention d'un médicament.

30 10) Utilisation d'un polynucléotide selon une quelconque des revendications 4 ou 5 pour l'obtention d'un médicament.

35 11) Utilisation selon une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement immunothérapique de tumeurs exprimant une protéine K-ras, H-ras ou N-ras mutée par substitution de la glutamine en position 61 par une

REVENDICATIONS

1) Peptide ras muté immunogène présenté par le CMH I, choisi parmi les peptides suivants :

- ILDTAGREEY (SEQ ID NO: 1) ;
- ILDTAGPEEY (SEQ ID NO: 2) ;
- ILDTAGKEEY (SEQ ID NO: 3) ;
- ILDTAGHEEY (SEQ ID NO: 4) ;
- ILDTAGLEEY (SEQ ID NO: 5).

2) Composition comprenant au moins un peptide ras muté selon la revendication 1.

3) Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un ou plusieurs autre(s) peptide(s) immunogène(s).

4) Polypeptide chimérique comprenant une ou plusieurs copies d'un peptide ras muté selon la revendication 1.

5) Polypeptide chimérique selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une ou plusieurs copies d'un ou plusieurs autre(s) épitope(s) immunogène(s).

6) Polynucléotide codant pour un polypeptide chimérique selon une quelconque des revendications 4 ou 5.

7) Utilisation d'un peptide selon la revendication 1, pour l'obtention d'un médicament.

8) Utilisation d'une composition selon une quelconque des revendications 2 ou 3, pour l'obtention d'un médicament.

9) Utilisation d'un polypeptide chimérique selon une quelconque des revendications 4 ou 5 pour l'obtention d'un médicament.

10) Utilisation d'un polynucléotide selon la revendication 6 pour l'obtention d'un médicament.

11) Utilisation selon une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement immunothérapique de tumeurs exprimant une protéine K-ras, H-ras ou N-ras mutée par substitution de la glutamine en position 61 par une arginine, une proline, une lysine, une histidine ou une leucine.

arginine, une proline, une lysine, une histidine ou une leucine.

5 12) Utilisation selon une quelconque des revendications 7 à 11, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement immunothérapique de tumeurs chez un patient HLA-A*0101, ou HLA-B*1501.

12) Utilisation selon une quelconque des revendications 7 à 11, caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement immunothérapique de tumeurs chez un patient HLA-A*0101, ou HLA-B*1501.

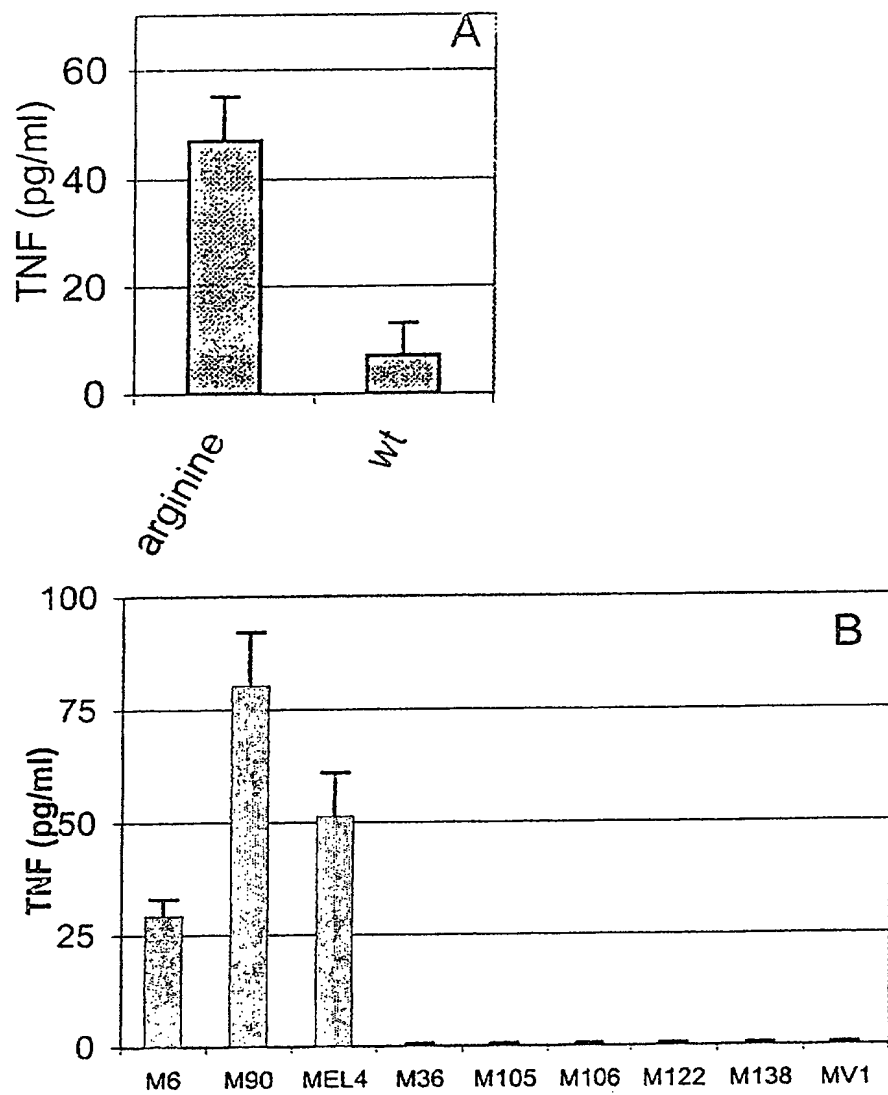


Figure 1

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM
UNIVERSITE DE NANTES

<120> PEPTIDES RAS MUTES ET LEUR UTILISATION EN
IMMUNOTHERAPIE

<130> MJPCb598-64

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 1

Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Arg	Glu	Glu	Tyr
1				5					10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 2

Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Pro	Glu	Glu	Tyr
1				5					10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 3

Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Lys	Glu	Glu	Tyr
1				5					10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 4
Ile Leu Asp Thr Ala Gly His Glu Glu Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: peptide
synthétique

<400> 5
Ile Leu Asp Thr Ala Gly Leu Glu Glu Tyr
1 5 10

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv598/64
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 02703
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PEPTIDES RAS MUTES ET LEUR UTILISATION EN IMMUNOTHERAPIE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1	Nom	LINARD
	Prénoms	Boris
Adresse	Rue	3, rue de Libourne
	Code postal et ville	[4 4 8 0 0] SAINT-HERBLAIN
Société d'appartenance (facultatif)		
2	Nom	JOTEREAU
	Prénoms	Francine
Adresse	Rue	6, Place du 116ème Régiment d'Infanterie
	Code postal et ville	[4 4 3 0 0] NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
3	Nom	BENLALAM
	Prénoms	Houssem
Adresse	Rue	1, rue Rameau
	Code postal et ville	[4 4 0 0 0] NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Paris, le 2 juillet 2002 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

Marie José Vialle-Presles

DEPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 44 W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv598/64
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		02 02703
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
PEPTIDES RAS MUTES ET LEUR UTILISATION EN IMMUNOTHERAPIE.		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
CABINET ORES 6, avenue de Messine 75008 PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Nom	DIEZ
	Prénoms	Elizabeth
Adresse	Rue	13, rue Ramée la Bourchinière
	Code postal et ville	4 4 6 9 0 SAINT-FIACRE SUR MAINE
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Nom	GUILLOUX
	Prénoms	Yannick
Adresse	Rue	19, rue du Loquidy
	Code postal et ville	4 4 3 0 0 NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> 3	Nom	LABARRIERE
	Prénoms	Nathalie
Adresse	Rue	10, rue Léon Bérard
	Code postal et ville	4 4 2 0 0 NANTES
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 2 juillet 2002 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)		

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.